茶尺蠖水通道蛋白 EoAQP1 的 cDNA 克隆、多克隆抗体制备及亚细胞定位

李良德[#], 王定锋[#], 刘丰静, 李慧玲, 张 辉, 吴光远[*]

(福建省农业科学院茶叶研究所, 福建福安 355015)

摘要:【目的】水通道蛋白(aquaporin, AQP)是一种广泛存在于哺乳动物、植物和微生物中的跨膜转运蛋白,它在细胞水分运输、离子选择透过性和渗透压平衡等过程中发挥着重要的作用。本研究旨在分析茶尺蠖 *Ectropis obliqua* Prout 水通道蛋白 AQP1 的基因特性,在制备多克隆抗体的基础上了解其亚细胞定位分布。【方法】采用同源克隆方法并结合 RACE 技术克隆茶尺蠖 AQP1 的基因全长,通过生物信息学网站和软件分析茶尺蠖 AQP1 的生物学信息;通过实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)检测茶尺蠖 *AQP1* 在不同发育阶段和 6 龄幼虫不同组织中的相对表达量;通过原核表达、镍柱纯化并免疫新西兰兔制备了茶尺蠖 AQP1 的多克隆抗体;通过荧光显微镜观测了茶尺蠖 AQP1 在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 胚胎细胞 S2 中的定位分布,并利用多克隆抗体进行了 Western blot 验证。【结果】克隆并鉴定了茶尺蠖 *AQP1* 全长,将其命名为 *EoAQP1*(GenBank 登录号: KT819587),*EoAQP1* cDNA 全长 1 826 bp,含有 780 bp 开放阅读框,编码 259 个氨基酸。系统进化树和氨基酸序列同源性比对表明,EoAQP1 在鳞翅目昆虫中高度保守。跨膜结构和水分渗透模拟表明,EoAQP1 具有经典的水分渗透模型。qRT-PCR 结果表明,*EoAQP1* 在不同发育时期和 6 龄幼虫不同组织中均有表达且差异显著。亚细胞定位结果表明,EoAQP1 以圆形颗粒状成群聚集于细胞膜周边,而在细胞膜、核膜和细胞质等处均不表达。多克隆抗体 Western blot 检测结果表明,EoAQP1 多克隆抗体特异性较好,可用于后续相关实验。【结论】获得了 *EoAQP1* 的 cDNA 序列,明确了 EoAQP1 的生物学特征,阐明了 *EoAQP1* 的时空表达特性,成功制备了 EoAQP1 多克隆抗体,初步了解了 EoAQP1 的亚细胞定位,为进一步研究 EoAQP1 的水分渗透机理奠定了分子基础。

关键词: 茶尺蠖; 水通道蛋白; 克隆; 生物信息学; 表达模式; 亚细胞定位; 多克隆抗体

中图分类号: Q966　**文献标识码:** A　**文章编号:** 0454-6296(2016)04-382-10

cDNA cloning, preparation of polyclonal antibody and subcellular localization of aquaporin 1 (AQP1) in *Ectropis obliqua* (Lepidoptera: Geoqmetridae)

LI Liang-De[#], WANG Ding-Feng[#], LIU Feng-Jing, LI Hui-Ling, ZHANG Hui, WU Guang-Yuan[*] (Tea Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fu'an, Fujian 355015, China)

Abstract:【Aim】Aquaporin (AQP) is one of the transmembrane proteins widely existing in mammals, plants, and microorganisms, and plays an important role in the processes of cell moisture transportation, selective ion permeability and osmotic balance. This study aims to understand the gene characteristics of AQP1 from *Ectropis obliqua* Prout, and its subcellular localization based on polyclonal antibody preparation.

基金项目: 国家茶叶产业技术体系(CARS-23); 福建省现代农业茶叶产业技术体系(2014NK04); 福建省自然科学基金项目(2015J01099); 福建省农业科学院科技创新项目(2014CX-8)

作者简介: 李良德, 男, 1988 年 1 月生, 福建泉州人, 硕士, 研究实习员, 研究方向为昆虫生理学和毒理学, E-mail: liliangde_scau@163.com; 王定锋, 男, 1981 年 4 月生, 福建龙岩人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为害虫生物防治和杀虫微生物分子生物学, E-mail: wangdf2013@yahoo.com

[#]共同第一作者 Authors with equal contribution

[*]通讯作者 Corresponding author, E-mail: gywupt@163.com

收稿日期 Received: 2016-01-06; 接受日期 Accepted: 2016-03-21

【Methods】The complete cDNA of *AQP*1 was cloned from *E. obliqua* by RT-PCR and RACE technologies. The bioinformatics analysis was carried out by online website and edited on the bioinformatics software. The mRNA relative expression levels in different developmental stages and different tissues of the 6th instar larvae of *E. obliqua* were investigated by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). The polyclonal antibody was prepared by immunizing a male New Zealand white rabbit after prokaryotic expression and Ni-sepharose purification. Subcellular localization in *Drosophila melanogaster* embryonic cells (S2 cells) was observed by fluorescence microscope, and Western blot analysis was performed with the polyclonal antibody of AQP1 from *E. obliqua*.【Results】The *AQP*1 cDNA was cloned successfully from *E. obliqua* and named *EoAQP*1 (GenBank accession no.: KT819587). It is 1 826 bp in length, including a 780 bp of open reading frame (ORF), which encodes 259 amino acids. Phylogenetic tree analysis and alignment of amino acid sequences showed that EoAQP1 is highly conserved with AQP1 proteins of other species of Lepidoptera. Transmembrane structure and water percolating simulation showed that EoAQP1 has a classical water percolation model. The qRT-PCR result revealed that *EoAQP*1 was expressed in all developmental stages and various tissues of the 6th instar larvae of *E. obliqua* at different mRNA expression levels. Subcellular localization showed that EoAQP1 aggregated around cell membrane with circular and granular models, but was not expressed in cell membrane, cytoplasm or nuclear membrane. Western blot analysis demonstrated that the obtained polyclonal antibody had high specificity and could be used for further experiments.【Conclusion】The nucleotide sequence, bioinformatics and expression profiling of aquaporin 1 gene *EoAQP*1 in *E. obliqua* were clarified. With the obtained polyclonal antibody, its subcellular localization of EoAQP1 was preliminarily investigated. These results provide a foundation for further research on the mechanism of water infiltration of EoAQP1.

Key words: *Ectropis obliqua*; aquaporin; cloning; bioinformatics; expression patterns; subcellular localization; polyclonal antibody

昆虫具有特殊的消化系统，许多昆虫、特别是刺吸式昆虫，如大青叶蝉 *Cicadella viridis* 和豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* 在取食过程中会摄入过多的水分，此时肠道组织必须快速排除多余的水分以保证体内渗透压的平衡(Liu *et al*., 2011)。例如，一些半翅目昆虫在大量刺吸低浓度木质部营养液后，中肠组织渗透压将低于血淋巴系统，导致消化系统渗透压失去平衡。因而，该类昆虫进化出了一个特殊的细胞组织——过滤器(filter chambers, FC)，它能吸收中肠多余的水分并过滤至后肠，以应对消化系统渗透压不平衡的问题(Rosell *et al*., 2003; Fonseca *et al*., 2010; Mathew *et al*., 2011)；而有些吸血性昆虫，如双翅目昆虫冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 能在吸食寄主血液后，通过位于消化道中、后肠交界处的特殊组织——马氏管(Malpighian tubules)，在短时间内以尿液的形式，快速排出吸食的多余水分(Bradley, 1987)；又如长红猎蝽 *Rhodnius prolixus* 能一次性吸收超过自身血液体积 10 倍的寄主血液，并通过马氏管将多余的水分迅速排出(Echevarria *et al*., 2001)。

对于该种生理现象，Beuron 等(1995)以大青叶蝉 *C. viridis* 消化系统为对象做了进一步研究，他们发现 *C. viridis* 过滤室表皮细胞膜上富集一种专一的转运水分的跨膜蛋白，后来证实为水通道蛋白(aquaporin, AQP)，并将它称为 AQPcic。AQPcic 的发现，开辟了昆虫 AQP 水分渗透研究的新领域，并在双翅目(Campbell *et al*., 2008)、鳞翅目(Izumi *et al*., 2006; 刘海远等, 2013)、半翅目(Shakesby *et al*., 2009)和同翅目(Mathew *et al*., 2011)等昆虫中发现了多种 AQP 成员蛋白。前人研究结果表明，AQP 不仅具有调节昆虫体内水分渗透平衡的作用，同时对抗冻、抗冷和抗干燥也具有重要的作用。例如，二化螟 *Chilo suppressalis* 能在极端环境 -25℃ 条件下正常越冬，利用 $HgCl_2$ 破坏 AQP 结构后，越冬幼虫将在 -20℃ 时受到损伤(Izumi *et al*., 2006)。

目前，已报道 AQP 存在于 59 种无脊椎动物中，其中节肢动物 33 种(Campbell *et al*., 2008)，但每一物种中只有一个或少数几个 AQP 的水分渗透功能被深入研究，且研究成果只是局限于简单的生理实验(如 pH、磷酸化和细胞外 Ca^{2+} 浓度的改变影响 AQP 对水分和其他溶质的渗透调节能力)以及在 AQP 的 mRNA 研究水平上，在蛋白水平研究中却相

对匮乏,其中一个重要原因就是缺乏一个可供研究的 AQP 商业抗体;同时,在昆虫细胞生物膜系统中,AQP 对细胞器(如线粒体膜和内质网膜等)的水分运输、选择性离子通过和调节渗透平衡同样扮演着重要的作用。目前,AQP 在昆虫组织中的定位已有不少报道(Campbell *et al*., 2008),而在细胞器中的准确定位却未见报道。

基于此,本研究选取茶尺蠖 *Ectropis obliqua* Prout 为研究对象,该虫又名茶尺蛾,俗称量寸虫、吊丝虫、拱拱虫,属鳞翅目(Lepidoptera)尺蛾科(Geometridae),是我国茶园中的重要害虫之一(李良德等, 2015)。本文利用 RACE 方法克隆了茶尺蠖 AQP 家族中 AQP1 cDNA 全长,并详细分析了该基因的生物信息学特征及在茶尺蠖不同龄期和不同组织的表达差异,同时制备并验证了多克隆抗体,初步了解了在细胞内的表达定位,为后续进一步深入研究 AQP1 在昆虫细胞内的渗透机理奠定分子基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫及细胞

试虫茶尺蠖(第 1 代)采自福建省农业科学院茶叶研究所试验茶园,于室内 24 ± 1℃,相对湿度 75%,光周期 12L∶12D 条件下长期饲养。供养 2 代后,收集并分离第 2 代末茶尺蠖的蛹,使第 3 代供养的茶尺蠖在卵期保持同步。分别于第 3 代 1 日龄的卵、1 -6 龄幼虫、蛹和成虫共 9 个发育阶段取样,置于 -80℃冰箱中保存备用;同时,将 1 日龄的 6 龄茶尺蠖幼虫置于解剖镜下,分离得到表皮、大脑、前胸腺、脂肪体、血淋巴和中肠共 6 个组织样品各 30 mg,液氮迅速冰冻后,迅速放于 -80℃中保存备用。亚细胞定位采用果蝇胚胎细胞系(S2 细胞系),该细胞系培养于添加 Grace's 昆虫细胞培养基(含 10% 胎牛血清)的培养皿中(直径为 3.5 cm),每 2 d 更换一次培养基,于恒温箱中,27℃条件下长期培养。

1.2 菌株、载体和试剂

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 和 BL21(DE3)购自 TransGen 公司;原核表达载体 pET32a 和昆虫真核表达载体 pAc5.1/V5 购自 Novagengen 公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司;总 RNA 提取及反转试剂盒、DNA 凝胶回收试剂为 OMEGA 公司产品;SMART RACE™ Kit 试剂盒及 3′ Full RACE Kit 试剂盒为天根生化科技有限公司产品;实时荧光定量试剂盒(SYBR Primer Script RT-PCR Kit)、DNA Taq 聚合酶、DNA Marker (DL2000)、氨苄青霉素 Amp、诱导剂 IPTG 和载体 pMD20-T 等常规分子试剂均为 TaKaRa 公司产品;质粒小提试剂盒、蛋白 Marker、考马斯亮蓝染色液、羊抗兔二抗、增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒均购自 Thermo 公司;Lipod 2000 转染试剂、Grace's 昆虫细胞培养基、胎牛血清(FBS)购自 Invitrogen 公司;果蝇 S2 细胞系购自上海拜力生物科技有限公司。

1.3 总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成

参照 OmegaBio-tech 总 RNA 提取试剂盒说明书(E. Z. N. A. ™Total RNA Kit,美国),选取茶尺蠖和 6 龄幼虫和成虫各 3 头,混样后液氮冷冻研磨提取总 RNA,并用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。参照总 RNA 反转试剂盒说明书(Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit,加拿大),以提取的总 RNA 为模板,取 1 μg 于 20 μL 混合体系中,以 oligo$(dT)_{18}$为引物反转录合成 cDNA 第一链。

1.4 茶尺蠖 AQP1 基因片段克隆

根据 NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)已登入的甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*(GenBank 登录号: KC999953.1)、二化螟 *Chilo suppressalis*(GenBank 登录号: JQ011315.1)、梨小食心虫 *Grapholita molesta*(GenBank 登录号: AB469882.1)、家蚕 *Bombyx mori*(GenBank 登录号: NM_001043454.1)和致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*(GenBank 登录号: XM_001865697.1)的基因序列,设计一对茶尺蠖 AQP1 的简并引物 AQP1-partial-F1 和 AQP1-partial -R1(表 1)。

以提取的混合样 cDNA 为模板,RT-PCR 扩增目的条带。反应程序为: 94℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 60℃复性 30 s, 72℃延伸 1 min, 共 33 个循环; 72℃延伸 10 min; 4℃保存。取 7 μL 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,将目的条带与载体 pMD20-T 进行重组,转入感受态细胞 DH5α 中进行培养。最后,经蓝白斑筛选后送样测序。本研究所有测序工作均由上海英潍捷基贸易有限公司完成。

1.5 茶尺蠖 AQP1 基因 5′和 3′ RACE 扩增

在已获得的茶尺蠖 AQP1 片段序列基础上,分别于 5′和 3′区域各设计一对特异性嵌套引物 AQP1-outer-R2 和 AQP1-inner-R3,以及 AQP1-outer-F2 和 AQP1-inner-F3(表 1)进行 5′和 3′ RACE 扩增。参照 RACE 扩增试剂盒说明书,5′ RACE 反应程序为: 94℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 65℃复性 30 s, 72℃延伸 2 min, 35 个循环; 72℃延伸 10 min; 4℃

保存。3′ RACE 反应程序为：94℃预变性 3 min；94℃变性 30 s，68℃复性 30 s，72℃延伸 1.5 min，33 个循环；72℃延伸 10 min；4℃保存。最后，将测序结果进行拼接，得到基因全长序列。

1.6　茶尺蠖 AQP1 生物信息学分析

茶尺蠖 AQP1 基因序列全长由 DNAstar 软件拼接得到；编码蛋白理化性质由 ProtParam 在线网站（http://web.expasy.org/protparam/）分析得到；系统进化树由 MEGA 4.1 软件中的邻位相连法（neighbor-joining，NJ），进行 1 000 次重复分析比对后构建获得；氨基酸多重序列比对由 Multalin 5.4.1 在线网址（http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html）分析比对得到；氨基酸跨膜结构域由 Smart 在线网站（http://smart.embl-heidelberg.de/）分析得到；蛋白质三级构象由 Swiss Model 在线网站（http://www.swissmodel.expasy.org/）模拟得到；水分渗透模型由 Swiss PDB Viewer 4.1 软件编辑得到。

1.7　茶尺蠖 AQP1 基因表达模式检测

以茶尺蠖 AQP1 基因全长序列为模板，设计一对荧光定量 PCR 引物 AQP1-qPCR-F4 与 AQP1-qPCR-R4（表 1），以茶尺蠖 18S rRNA（GenBank 登录号：EU482035.1）为内参基因，设计另一对荧光定量引物 18S-IP-F 与 18S-IP-R（片段长 400 bp）（表 1），分析茶尺蠖 AQP1 基因在不同发育时期和不同组织中的相对表达量。

荧光定量反应体系为：SYBR Premix Ex Taq™ 10.0 μL，cDNA 1.0 μL，AQP1-qPCR-F4 与 AQP1-Qpcr-R4（18S-IP-F 与 18S-IP-R）各 1.0 μL，加入7.0 μL ddH_2O 至总体系 20 μL。反应程序为：95℃预变性 30 s；95℃变性 5 s，60℃复性 30 s，72℃延伸 40 s，39 个循环。反应结束后对标准曲线和溶解曲线进行综合分析，以检测定量引物的可行性并排除非特异性 PCR 产物的污染。最后，采用比较 C_T 值相对定量法 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算出不同发育时期及不同组织中茶尺蠖 AQP1 基因的相对表达量。

1.8　茶尺蠖 AQP1 原核表达和多克隆抗体的制备

根据已获得的茶尺蠖 AQP1 的编码区序列，在 5′端和 3′端分别加入双酶切位点 *Xba*I 和 *Xho*I，设计一对特异性引物 AquORF-XbaIF 与 AquORF-XhoIR（表 1），以合成的茶尺蠖 cDNA 第一链为模板，克隆获得茶尺蠖 AQP1 的 ORF 序列。再利用限制性内切酶 *Xba*I 和 *Xho*I 对 AQP1 ORF 克隆产物和 pET32a 空质粒进行双酶切，利用 T4 连接酶将 AQP1 酶切产物连接至 pET32a 载体上（pET32a-EoAqu），16℃孵育过夜后，将重组质粒转入感受态细胞 DH5α 中过夜培养。最后，利用质粒提取试剂盒提取重组质粒并进行 PCR 和双酶切鉴定。

将构建成功的重组质粒转入表达菌株 BL21（DE3）细胞中，37℃过夜培养后，挑取单菌落接种到含 Amp 的 LB 液体培养基中，37℃下活化过夜后，取 150 μL 菌液接种到 15 mL LB 培养基中，37℃下培养至 OD_{600} 值为 0.6～0.8 时，加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L，于 28℃条件下进行诱导表达。诱导结束后，冷冻离心菌液，弃上清，收集菌体。在冰浴的条件下破碎菌体，吸取破碎后的菌液至冷冻离心机中，12 000 r/min 离心 10 min 后，分别向沉淀和上清中加入 SDS-PAGE 上样缓冲液。

样品经 SDS-PAGE 电泳后，浸泡于考马斯亮蓝染色液中，经染色过夜脱色后，用凝胶成像系统拍照。最后，将制备的茶尺蠖 AQP1 蛋白经镍柱纯化后，以 1.0 μg/mL 的浓度进行包被，免疫新西兰兔后获得兔多抗血清，再经纯化后，获得抗原亲和纯化的多克隆抗体。抗体制备由杭州华安生物技术有限公司完成。

1.9　茶尺蠖 AQP1 亚细胞定位

分别在 GFP（从商业载体 pEGFP-N1 中克隆得到）编码区 5′和 3′端中加入酶切位点 *Bst*BI 和 *Pme*I，设计一对特异性引物 GFP-BstBIF 和 GFP-PmeIR（表 1），克隆获得 GFP ORF 序列。再利用限制性内切酶 *Bst*BI 和 *Pme*I 对 GFP ORF 克隆产物和 pAc5.1/V5 空质粒进行双酶切，利用 T4 连接酶将 GFP 酶切产物连接至 pAc5.1/V5 载体上，获得带有 GFP 标签的 pAc5.1-GFP 重组质粒。pAc5.1-GFP 载体构建成功后，以同样的方法，利用限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Xho*I 设计一对特异性引物 AquORF-EcoRIF 和 AquORF-XhoIR（表 1），将茶尺蠖 AQP1 基因构建至 pAc5.1-GFP 载体的 GFP 上游，获得同时携带 EoAqu 和 GFP 基因的 pAc5.1-EoAqu-GFP 重组质粒。

重组质粒构建成功后，测定其浓度，参照 LipoD 2000 转染试剂操作说明，将其转染入事先备好的果蝇胚胎细胞系（S2 细胞系）（转染时细胞融合度达到 70%～80%），置于 27℃条件下培养。转染 24 h 后，利用荧光显微镜观察 GFP 蛋白和融合蛋白的表达情况，根据细胞核和细胞膜的位置初步判断茶尺蠖 AQP1 蛋白的亚细胞定位。

1.10　茶尺蠖多克隆抗体 Western blot 检测

重组质粒 pAc5.1-GFP 和 pAc5.1-EoAqu-GFP 转染细胞 48 h 后，将细胞研磨粉碎后提取总蛋白，12 000 r/min 离心 10 min 后，取上清液 −80℃冻存

备用。总蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,采用电转法(90 mA, 1.5 h)将蛋白转至硝酸纤维素(NC)膜上,用 Western blot 膜封闭液振荡封闭 12 h 后,分别孵育事先制备的兔多克隆抗体(稀释倍数 1∶5 000)和 GFP 单克隆抗体(稀释倍数 1∶1 000)(内参抗体)。一抗孵育结束后,将 NC 膜置于二抗(羊抗兔)中,室温孵育 3 h 后,通过辣底过氧化物酶使二抗显色,从而显示靶标蛋白。

1.11 数据统计与分析

荧光定量 PCR 测定的数据置于 GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software)软件中选择平均值 ± 标准误(*SE*)进行作图。采用 SPSS 13.0 邓肯氏新复极差检验(Duncan's multiple range test)单因素方差(one-way ANOVA)方法进行差异性显著分析($P < 0.05$)。

表 1 实验中所用引物

Table 1 Primers used in this experiment

基因和质粒名称 Gene and plasmid names	实验目的 Purposes	引物名称 Primer name	引物序列(5′–3′) Primer sequences
*EoAQP*1	中间片段克隆 Cloning of intermediate fragment	AQP1-partial-F1	GAYGTGACRGACAACAAGCTGAT
		AQP1-partial-R1	CCKATRGCGAGGGGCGCGGA
	5′ RACE	AQP1-inner-R2	CTAGCTCCGCCACCAGCTGC
		AQP1-out-R3	TCTCGATGGTGATGCAGGAAGCC
	3′ RACE	AQP1-inner-F2	CTTGTGTTGGTGGTGCATGGC
		AQP1-out-F3	CCAGAGTTGAGTCTTTCTCACGG
	定量 PCR qRT-PCR	AQP1-qPCR-F4	GCCCAAGACCACGACCAT
		AQP1-qPCR-R4	ACGCCATGCACCACCAAC
pET32a-EoAqu	原核表达载体 Prokaryotic expression vector	AquORF-XbaIF	gtc TCTAGA ATGAAAACGGATTACGCTATGGATG
		AquORF-XhoIR	act CTCGAG GAAGTCGTAGGAGCCACTC
pAc5.1-GFP	GFP 表达载体 GFP expression vector	GFP-BstBIF	tac TTCGAA ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
		GFP-PmeIR	cga GTTTAAAC TTACTTGTACAGCTCGTCCAT
pAc5.1-EoAqu-GFP	真核表达载体 Eukaryotic expression vector	AquORF-EcoRIF	gat GAATTC ATCAAAATGAAAACGGATTACGCTATGGATG
		AquORF-XhoIR	cag CTCGAG GAAGTCGTAGGAGCCACTC
18S rRNA	内参引物 Internal primer	18S-IP-F5	GAGAAACGGCTACCACATCCA
		18S-IP-R5	GCAAATGCTTTCGCTGATGTT

小写字母表示保护碱基; 方框示酶切位点; 下划线示促表达序列。Lowercase letters represent protective base; box represens restriction enzyme site; underline represens promoting expression sequence.

2 结果

2.1 茶尺蠖 AQP1 基因全长克隆

通过简并引物 AQP1-partial-F1 和 AQP1-partial-R1 的同源扩增,获得 500 bp 的片段;再根据已获得的片段序列进行 5′ RACE 和 3′ RACE 扩增,分别得到 369 bp 的 5′端序列和 1 179 bp 的 3′端序列;将 3 段序列进行拼接,得到大小为 1 826 bp 的全长序列,将其命名为 *EoAQP*1 (GenBank 登录号: KT819587)。采用 DNAstar 软件对 *EoAQP*1 全长序列进行分析显示,该基因含有 780 bp 开放阅读框,编码 259 个氨基酸,5′和 3′端长度分别为 257 和 789 bp,含有 27 个 poly(A)末端结构;采用 ProtParam 在线网站对编码区蛋白进行理化性质分析表明,该蛋白含有 34 个氨基酸残基,分子量为 27.12 kDa,理论等电点为 8.15,分子式为 $C_{1230}H_{1971}N_{317}O_{346}S_{12}$,总平均疏水性为 0.628。

2.2 EoQP1 生物信息学分析

2.2.1 *EoAQP*1 系统进化树分析: 通过 NCBI Blast 获得与茶尺蠖 *AQP*1 相似性(similarity)较高的其他 *AQP*1 氨基酸序列,将其制成 fasta 文档后导入 MEGA 4.1 软件中,采用邻位相连法(neighbor-joining, NJ)进行 1 000 次重复比对后获得 *EoAQP*1 的系统进化树图谱(图 1)。由该图谱可知,EoAQP1 与鳞翅目昆虫梨小食心虫 *Grapholitha molesta* 亲缘关系最近,与双翅目昆虫桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 亲缘关系最远。

2.2.2 EoAQP1 氨基酸多重序列比对: 经 NCBI Blast 比对后发现, EoAQP1 与玉带凤蝶 *Papilio polytes*(GenBank 登录号: BAM19007.1)、梨小食心虫 *G. molest*(GenBank 登录号: BAH47554.1)、二化螟 *C. suppressalis*(GenBank 登录号: AFC34082.1)、柑橘凤蝶 *P. xuthus*(GenBank 登录号: BAM17858.1)、斜纹夜蛾 *S. litura*(GenBank 登录号: AGT50943.1)、致倦库蚊 *C. quinquefasciatus*(GenBank 登录号: XP_

001865732.1)、埃及伊蚊 *A. aegypti*（GenBank 登录号：XP_001656931.1）和黑翅果蝇 *Drosophila pseudoobscura* AQP1（GenBank 登录号：XP_002138347.1）的氨基酸序列一致性分别为 77%，77%，76%，76%，76%，75%，67% 和 67%。将这些相似性较高的物种氨基酸序列下载后，导入到 Multalin 5.4.1 软件中，在线比对后获得 EoAQP1 氨基酸多重序列比对图（图 2）。由图可以看出，EoAQP1 除个别序列外（如第 130－140，220－230 和 240－250 位点氨基酸），其余序列相似性较低，表明 EoAQP1 在昆虫中呈现相对不保守的进化特性。

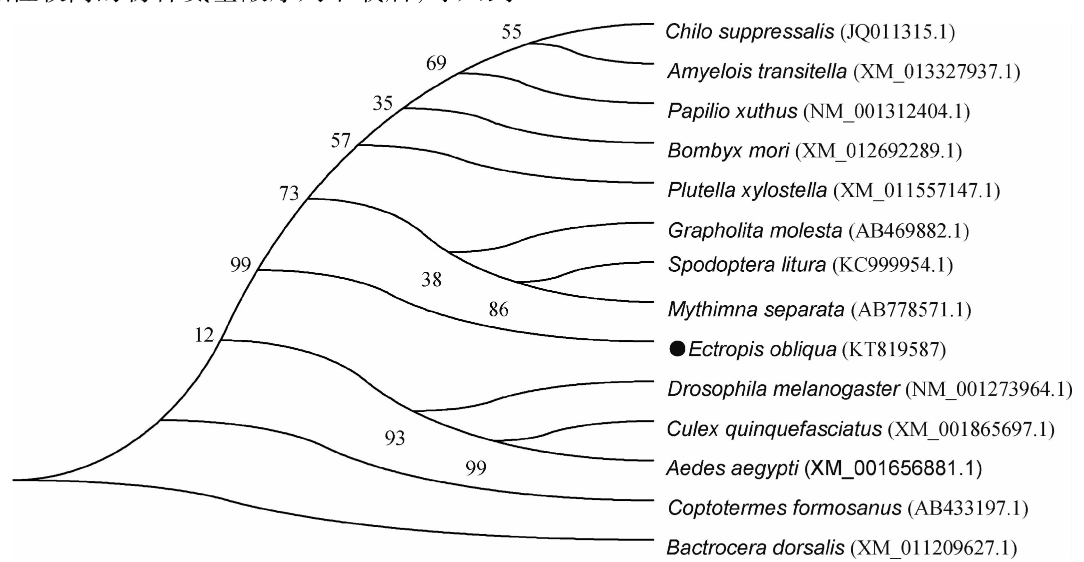


图 1　基于氨基酸序列构建的茶尺蠖 *EoAQP1* 基因及其他昆虫 AQP1 基因的系统进化树分析

Fig. 1　Phylogenetic tree analysis of *EoAQP1* gene from *Ectropis oblique* and AQP1 genes from other insects based on amino acid sequence

物种名及 AQP1 基因 GenBank 登录号 Species names and GenBank accession numbers of AQP1 genes：二化螟 *Chilo suppressalis*（JQ011315.1）；脐橙螟 *Amyelois transitella*（XM_013327937.1）；柑橘凤蝶 *Papilio xuthus*（NM_001312404.1）；家蚕 *Bombyx mori*（XM_012692289.1）；小菜蛾 *Plutella xylostella*（XM_011557147.1）；梨小食心虫 *Grapholita molesta*（AB469882.1）；斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*（KC999954.1）；粘虫 *Mythimna separata*（AB778571.1）；黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（NM_001273964.1）；致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*（XM_001865697.1）；埃及伊蚊 *Aedes aegypti*（XM_001656881.1）；白蚁 *Coptotermes formosanus*（AB433197.1）；桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis*（XM_011209627.1）。分支上的不同数字代表不同物种间亲缘关系的远近。Different numbers on the branches represent the closeness of genetic relationship between different insects.

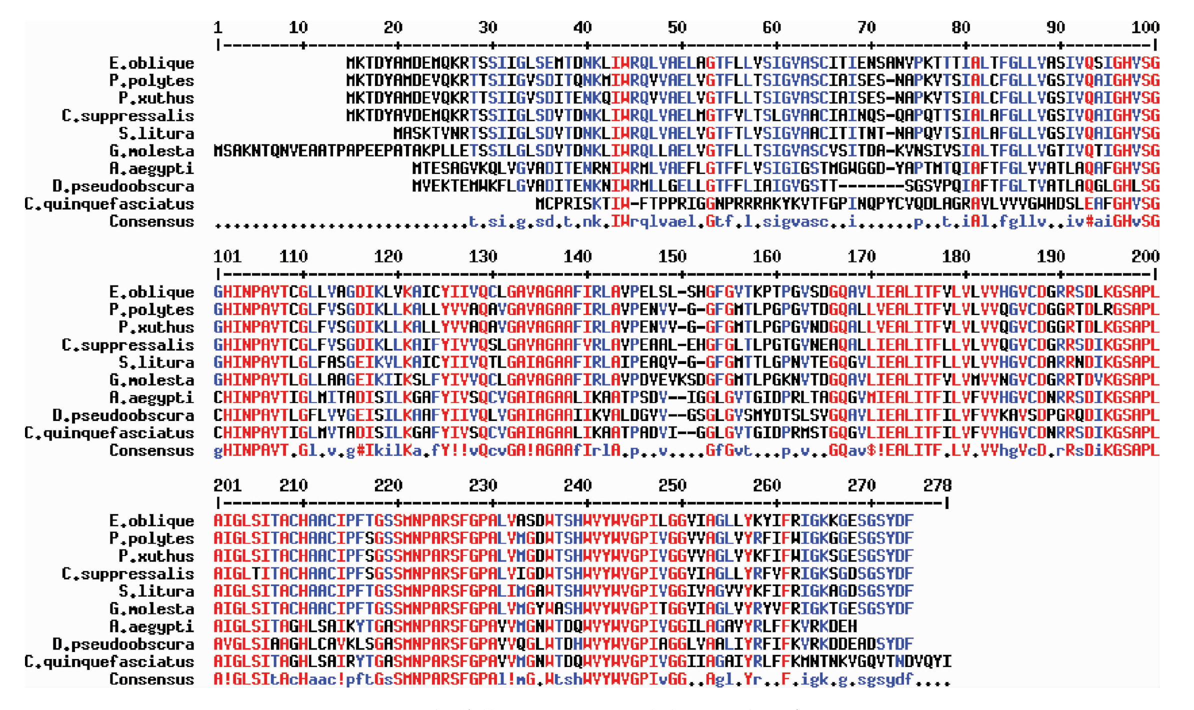


图 2　EoAQP1 与其他昆虫 AQP1 蛋白氨基酸多重序列比对图

Fig. 2　Alignment of amino acid sequences of EoAQP1 and AQP1 proteins from other insects

物种名及 AQP1 基因 GenBank 登录号参见图 1。不同颜色代表不同物种 AQP1 蛋白的相似性高低，相似性由高至低分别为：红、蓝和黑色。

2.2.3 EoAQP1 跨膜结构与水分渗透模型模拟：采用 Smart 在线网站分析了 EoAQP1 的编码序列，表明该肽链能在细胞膜上往返折叠形成 6 个串联的疏水跨膜区(图 3：a～f)，分别位于编码序列的第33－55，65－87，108－130，153－172，185－204 和224－246 位点上，并由 5 条半圆环肽链相连(图 3：1～5)。同时，在 a 与 b 及 e 与 f 跨膜区之间具有 2 个高度保守的天冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸(Asn-Pro-Ala，NPA)特征性序列并对称分布于膜的磷脂双层之间(图 3：环 2 和环 5)。

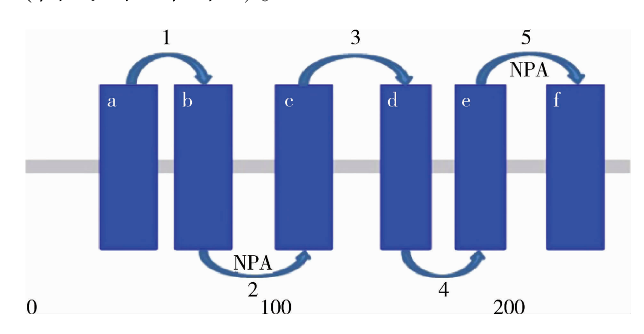


图 3 EoAQP1 跨膜结构图

Fig. 3 Transmembrane structure of EoAQP1 protein

a－f：EoAQP1 不同疏水跨膜域 Different transmembrane regions of EoAQP1；1－5：EoAQP1 不同环肽 Different cyclopeptides of EoAQP1.

采用 Swiss Model 在线网站对 EoAQP1 蛋白构象进行模拟表明，该蛋白呈现 3 个经典的跨膜结构，并以 α 螺旋为主，包含部分 β 折叠(图 4：A)；采用 Swiss PDB Viewer 4.1 软件对该构象进一步编辑处理，得到水分渗透模型(图 4：A)。从该模型中可以看出，两个特征性序列 NPA(图 4：A，红色和绿色部分)能在脂质双分子层的中心位置相互牵引，6 条跨膜 β 结构分别在四周将其包围，构成了一个供水分子通过的转运通道(图 4：A)。进一步分析发现，该 2 个 NPA 特征序列在膜内几乎呈 90°交叉(图 4：B)，于中心孔道处起稳定作用，有利于水分通过。最终，EoAQP1 在细胞膜间以四聚体的形式存在(图 4：C)，每一个稳定的单体作为一个独立的转运通道供水通过。

2.3 *EoAQP1* 时空表达分析

分析了 *EoAQP1* 和 18S rRNA 2 对定量引物的标准曲线。结果显示，2 对引物的扩增效率 *E* 分别为 98.3% 和 95.2%，相关系数 R^2 分别为 0.9996 和 0.9994，曲线斜率 Slope 分别为－3.390 和－3.432，表明该 2 对引物均满足 qRT-PCR 实验要求。qRT-PCR 结果显示，*EoAQP1* 在不同发育阶段和不同组织中均有表达，但相对表达量存在显著性差异。不同发育时期结果显示，*EoAQP1* 在成虫期和 6 龄若虫期表达量较高，在蛹期和卵期表达量非常低，其余龄期表达量变化不大，最高表达量成虫期是卵期的 361.84 倍(图 5：A)；不同组织结果显示，*EoAQP1* 在中肠中表达量最高，其次分别为血淋巴、大脑、脂肪体、前胸腺和表皮中，中肠中的表达量是表皮中的 14.35 倍(图 5：B)。

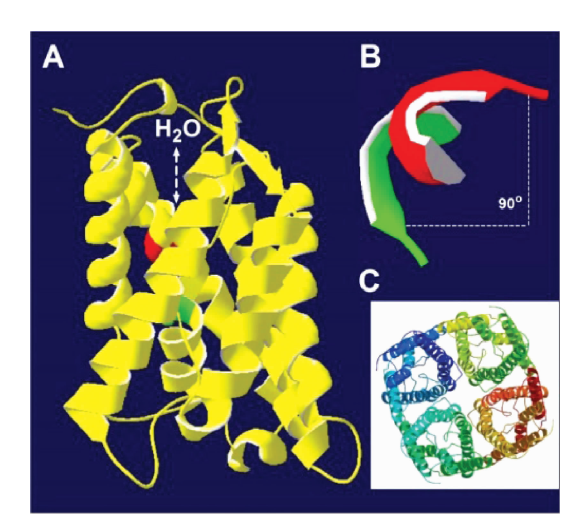


图 4 EoAQP1 水分渗透模型

Fig. 4 Water percolating model of EoAQP1 protein

A：EoAQP1 跨膜结构 Transmembrane structure of EoAQP1；B：NPA 交叉结构 Criss-cross construction of NPA；C：EoAQP1 四聚体结构 Tetrameric structure of EoAQP1.

2.4 EoAQP1 原核表达

转染 pET32a 空质粒的菌株未发现明显的目标条带(图 6：泳道 2)，而转染 pET32a-EoAqu 的菌株在 25.0 kDa 上游发现一条宽粗的目标蛋白(图 6：泳道 3)，其实际大小为 27.1 kDa。该蛋白经纯化后(图 6：泳道 4)，与阳性对照牛血清白蛋白 BSA (66.43 kDa)条带单一且明显(图 6：泳道 5)，证明 pET32a-EoAqu 质粒诱导后能稳定表达。

2.5 EoAQP1 亚细胞定位

将 GFP 蛋白与质粒 pAc5.1 进行拼接得到重组质粒 pAc5.1-GFP，再将 EqoAqu1 构建至 pAc5.1-GFP 质粒的 GFP 上游获得另一重组质粒 pAc5.1-EoAqu-GFP。分别将该 2 种质粒导入至果蝇胚胎细胞 S2 细胞系，转染 24 h 后，荧光显微镜下发现荧光蛋白 GFP 和融合蛋白 EoAQP1-GFP 均能在 S2 细胞内表达(图 7：A 和 D)。转入 pAc5.1-GFP 的细胞绿光分布均匀(图 7：A～C)，表明 GFP 标签可用于融合蛋白的亚定位观察。当 GFP 与 EoAqu1 蛋白融合后，绿色荧光以颗粒状成群(图 7：D～F)定位于细胞膜周边，而在细胞膜、细胞质和核膜等处均不表达。

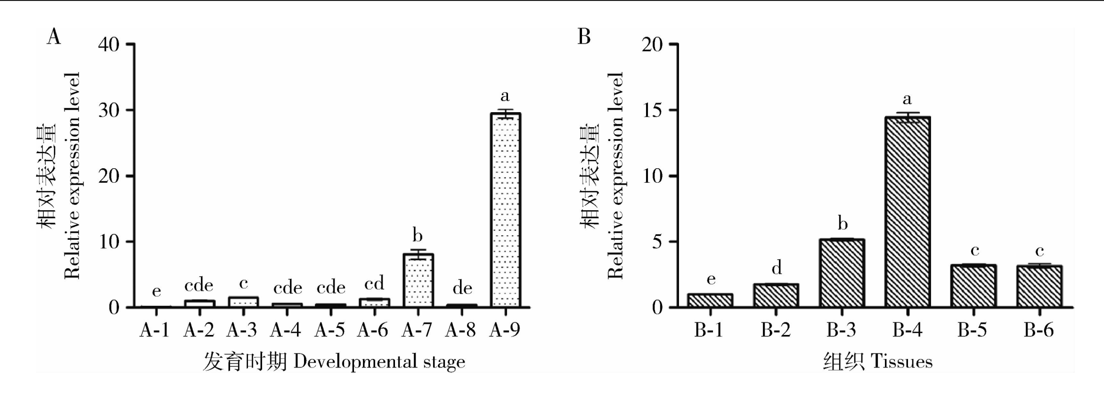


图 5　茶尺蠖不同发育时期和 6 龄幼虫不同组织中 *EoAQP*1 相对表达量

Fig. 5　Relative expression level of *EoAQP*1 in different developmental stages and different tissues of the 6th instar larvae of *Ectropis obliqua*

A-1：卵 Egg；A-2 – A-7：1 – 6 龄若虫 1st – 6th instar nymph，respectively；A-8：蛹 Pupa；A-9：成虫 Adult. B-1：表皮 Cuticle；B-2：前胸腺 Prothoracic gland；B-3：血淋巴 Hemolymph；B-4：中肠 Midgut；B-5：大脑 Brain；B-6：脂肪体 Fat body. 数据处理方法采用平均值 ± 标准误，每组实验重复 3 次，柱上不同字母代表 *EoAQP*1 在不同发育时期或不同组织的表达量差异显著（$P < 0.05$，邓肯氏新复极差检验）。Data are presented as means ± *SE* in triplicate, different letters above bars indicate significant differences among different developmental stages or different tissues（$P < 0.05$，Duncan's multiple range test）.

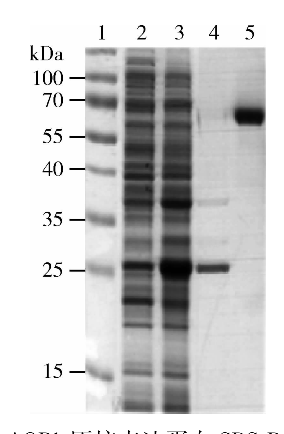


图 6　EoAQP1 原核表达蛋白 SDS-PAGE 电泳

Fig. 6　SDS-PAGE analysis of prokaryotic expression of EoAQP1

1：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；2：pET32a 空质粒 pET32a plasmid；3：IPTG 诱导的 pET32a-EoAqu pET32a-EoAqu after induction by IPTG；4：EoAQP1 纯化蛋白 Purified EoAQP1；5：牛血清白蛋白 Bovine serum albumin（BSA）.

2.6　EoAQP1 Western blot 验证

采用原核表达纯化的 EoAQP1 蛋白制备多克隆抗体，取出转入重组质粒 pAc5.1-GFP 和 pAc5.1-EoAqu-GFP 的细胞（转染 48 h），将细胞破碎并提取总蛋白用于 Western blot 检测，结果表明 pAc5.1-EoAqu-GFP 表达的融合蛋白 EoAqu-GFP（大小为 54.1 kDa）分别能被 GFP 抗体（图 7：G，泳道 2）和 EoAqu1 抗体（图 7：G，泳道 5）检测得到，而 pAc5.1-GFP 表达的 GFP 蛋白（大小为 27 kDa）能被 GFP 抗体检测得到（图 7：G，泳道 3），但不能被 EoAqu1 抗体检测得到（图 7：G，泳道 6）。该结果证明 EoAQP1 多克隆抗体制备成功，特异性较好，同时 pAc5.1-EoAqu-GFP 表达的 EoAqu-GFP 融合蛋白定位准确。

3　讨论

AQP 是一类家族成员蛋白，其中 AQP1 发现最早且最为经典（Benga，2009）。高等动物 AQP1 蛋白具有如下特征：所编码的氨基酸能组成一条单肽链，蛋白分子量约为 28.0 kDa，含有 6 个跨膜结构域和 5 个肽环（A ~ D）。其中，B 环和 D 环镶嵌在膜内，A，C 和 E 环环绕于膜外，整个跨膜结构呈 180°中心对称。并且，B 环和 D 环包含 2 个高度保守的 NPA 特征性序列，任何该系列的改变都将导致水分渗透能力的下降（Brooks *et al.*，2000；Yool *et al.*，2002；Detmers *et al.*，2006）。本研究获得的 EoAQP1 蛋白，高级构象以 α 螺旋为主，包含部分 β 折叠，所编码的肽链能够形成 6 个串联的疏水跨膜区，并由 5 条肽环相连，NPA 特征序列对称分布于第 2 和第 5 环肽上。最终，6 条跨膜区域分别在四周包围 NPA，形成了一个稳定的供水分子通过的水转运通道。该模拟结果与所报道的高等动物 AQP1 模型基本相符，表明 AQP1 主要功能位点在生物进化中相对保守。

茶尺蠖必须经历卵、若虫、蛹和成虫 4 个发育历期才能完成完整的生活史，qRT-PCR 结果显示，*EoAQP*1 在不同发育历期均有表达，表明茶尺蠖整个生活始的渗透平衡受 EoAQP1 蛋白的调控。在昆虫的 4 个生长发育阶段中，幼虫期是唯一的取食阶

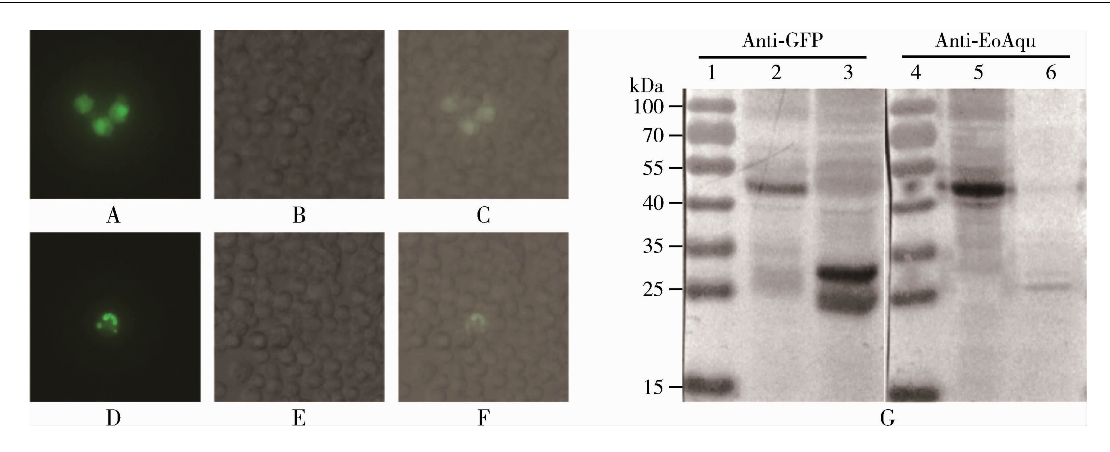


图 7 EoAQP1 蛋白亚细胞定位及 Western blot 检测

Fig. 7 Subcellular localization and Western blot analysis of EoAQP1 protein in S2 cells

A－C：pAc5.1-GFP 表达的 GFP 蛋白亚细胞定位 Subcellular localization of GFP protein from pAc5.1-GFP. A：GFP 蛋白的荧光图 GFP protein photoed under fluorescence；B：GFP 蛋白的非荧光图 GFP protein photoed without fluorescence；C：荧光与非荧光合并图 Merged picture of the former two. D－F：pAc5.1-EoAQP1-GFP 表达的 EoAQP1-GFP 蛋白亚细胞定位 Subcellular localization of EoAQP1-GFP protein from pAc5.1-EoAQP1-GFP. D：EoAQP1-GFP 蛋白的荧光图 EoAQP1-GFP protein photoed under fluorescence；E：EoAQP1-GFP 蛋白的非荧光图 EoAQP1-GFP protein photoed without fluorescence；F：EoAQP1-GFP 蛋白的荧光与非荧光合并图 Merged picture of the former two. G：EoAQP1 蛋白 Western blot 检测 Western blot analysis of EoAQP1 protein. 1，4：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；2：EoAqu-GFP 融合蛋白 GFP 抗体检测 EoAqu-GFP fusion protein detected by GFP antibody；3：GFP 荧光蛋白 GFP 抗体检测 GFP fluorescin detected by GFP antibody；5：EoAqu-GFP 融合蛋白 EoAQP1 抗体检测 EoAqu-GFP fusion protein detected by EoAQP1 antibody；6：GFP 荧光蛋白 EoAQP1 抗体检测 GFP fluorescin detected by EoAQP1 antibody.

段，为其他 3 个发育阶段积累生命活动所需的营养物质，当发育至蛹后便不再需要摄取营养，此时消化系统逐渐退化，特别是中肠组织会发生明显的缩短，失去消化食物的功能（Waku and Sumimoto，1971）。*EoAQP*1 在茶尺蠖消化系统中扮演着重要角色，因而随着肠道组织的退化在 6 龄若虫时期表达量较高，而蛹期大幅度下降。另外，*EoAQP*1 在成虫期表达量最高，表明 *EoAQP*1 对该期的渗透调节最为关键；昆虫中肠是分泌消化酶、消化食物和吸收养分的主要器官，内含围食膜（peritrophic membrane，PM）和不断更新的上皮细胞，PM 允许消化酶和消化后的小分子通过（Barbehenn and Martin，1992），而上皮细胞具有调节中后肠对食物中水的分再吸收作用（Cicero *et al*.，2009；Azuma *et al*.，2012），因此，EoAQP1 在中肠中具有高表达的特征；同时，血淋巴具有复杂的组分与特性，它担负着细胞内的多种生理功能，AQP1 对血淋巴的渗透压调控起着重要作用（Shakesby *et al*.，2009）。因而，EoAQP1 蛋白在血淋巴的高度聚集与人类 AQP 在红血细胞中的富集现象相似。

有报道发现，烟粉虱 *Bemisia tabaci* AQP1（BtAQP1）存在 2 种转录异构体，其中一种转录异构体主要定位于细胞膜中，而另一种在 C 端缺少 16 个氨基酸的异构体，主要定位于细胞质（Mathew *et al*.，2011）。另外，有研究发现人体 AQP2 主要分布于胞内小泡中，当血管加压后，AQP2 能够转移至细胞质膜中，增加细胞的水通透性（Ward *et al*.，1999）。本研究通过荧光显微镜观察了 EqoAqu1 在细胞内的定位分布，发现 EqoAqu1 以圆形颗粒状的形式成群聚集于细胞膜周边，而在细胞膜、核膜和细胞质等处均不表达。这是一个有趣的现象，可能与 EqoAqu1 在细胞内的转移或者依赖某一细胞器而行使特定渗透功能有关，但具体原因和准确的定位仍需我们后续作更进一步的工作。

在哺乳动物中，现已明确 AQP 参与一些列特殊的生理功能，包括细胞迁移（cell migration）、大脑和角膜肿胀、脂肪体脂肪堆积、神经信号转导和细胞凋亡等（Lee and Thevenod，2006；Campbell *et al*.，2008）；在昆虫动物中，少数研究发现，AQP 不仅对神经细胞的粘附性具有调节作用（Tatsumi *et al*.，2009），同时受蜕皮激素信号（ecdysone signaling）的调控（Gautam and Tapadia，2010）。这些研究成果对于借鉴、揭示 AQP1 在昆虫细胞内的渗透机理具有参考价值。本研究通过镍柱纯化、免疫新西兰兔获得 EoAQP1 多克隆抗体，该抗体经 Western blot 检测后表明特异性较好，可用于后续水分渗透机理的研究。

综上所述，本研究选取了茶尺蠖 AQP 家族中 AQP1 为研究对象，利用 RACE 方法克隆了其基因

的全长，并详细分析了该基因生物信息学特征及在不同龄期和不同组织的表达差异，初步了解了该基因在细胞内的表达定位并制备了多克隆抗体，为后续进一步深入研究 AQP1 在细胞内的渗透机理奠定分子基础。

参考文献（References）

Azuma M, Nagae T, Maruyama M, Kataoka N, Miyake S, 2012. Two water-specific aquaporins at the apical and basal plasma membranes of insect epithelia: molecular basis for water recycling through the cryptonephric rectal complex of lepidopteran larvae. *J. Insect Physiol.*, 58(4): 523–533.

Barbehenn RV, Martin MM, 1992. The protective role of the peritrophic membrane in the tannin-tolerant larvae of *Orgyia leucostigma* (Lepidoptera). *J. Insect Physiol.*, 38(12): 973–980.

Benga G, 2009. Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: past, present, and future. *IUBMB Life*, 61(2): 112–133.

Beuron F, Le Caherec F, Guillam MT, Cavalier A, Garret A, Tassan JP, Pelamarche C, Schultz P, Mallouh V, Hubert JF, Gouranton J, Thomas D, 1995. Structural analysis of a MIP family protein from the digestive tract of *Cicadella viridis*. *J. Biol. Chem.*, 270(29): 17414–17422.

Bradley TJ, 1987. Physiology of osmoregulation in mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.*, 32(1): 439–462.

Brooks HL, Regan JW, Yool AJ, 2000. Inhibition of aquaporin-1 water permeability by tetraethylammonium: involvement of the loop E pore region. *Mol. Pharmacol.*, 57(5): 1021–1026.

Campbell EM, Ball A, Hoppler S, Bowman AS, 2008. Invertebrate aquaporins: a review. *J. Comp. Physiol. B*, 178(8): 935–955.

Cicero JM, Brown JK, Roberts PD, Stansly PA, 2009. The digestive system of *Diaphorina citri* and *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 102(4): 650–665.

Detmers FJM, De Groot BL, Muller EM, Hinton A, Konings IBM, Sze M, Flitsch SL, Grubmuller H, Deen PMJ, 2006. Quaternary ammonium compounds as water channel blockers: specificity, potency, and site of action. *J. Biol. Chem.*, 281(20): 14207–14214.

Echevarria M, Ramirez-Lorca R, Hernandez CS, Gutierrez A, Mendez-Ferrer S, Gonzalez E, Toledo-Aral JJ, Ilundain AA, Whittembury G, 2001. Identification of a new water channel (Rp-MIP) in the Malpighian tubules of the insect *Rhodnius prolixus*. *Pflugers Arch.*, 442(1): 27–34.

Fonseca FV, Silva JR, Samuels RI, DaMatta RA, Terra WR, Silva CP, 2010. Purification and partial characterization of a midgut membrane-bound α-glucosidase from *Quesada gigas* (Hemiptera: Cicadidae). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 155(1): 20–25.

Gautam NK, Tapadia MG, 2010. Ecdysone signaling is required for proper organization and fluid secretion of stellate cells in the Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Dev. Biol.*, 54(4): 635–642.

Izumi Y, Sonoda S, Yoshida H, Danks HV, Tsumuki H, 2006. Role of membrane transport of water and glycerol in the freeze tolerance of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Insect Physiol.*, 52(2): 215–220.

Lee WK, Thevenod F, 2006. A role for mitochondrial aquaporins in cellular life-and-death decisions? *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 291(2): C195–C202.

Li LD, Wang DF, Li HL, Zhang H, Wu GY, 2015. Molecular cloning, bioinformatics analysis and expression profiling of ecdysteroid receptor gene *Eo-EcR* in *Ectropis obliqua* (Lepidoptera: Geometridae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(10): 1063–1071. [李良德，王定锋，李慧玲，张辉，吴光远，2015. 茶尺蠖蜕皮激素受体基因 *Eo-EcR* 的克隆、生物信息学分析和表达检测. 昆虫学报，56(10): 1063–1071]

Liu HY, Shu BS, Jiang CL, Li LD, Zhong GH, 2013. Molecular cloning, characterization and expression analysis of aquaporin1 (AQP1) gene in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(4): 339–349. [刘海远，舒本水，姜春来，李良德，钟国华，2013. 斜纹夜蛾水通道蛋白 1(AQP1)基因的克隆分子特性和表达分析. 昆虫学报，56(4): 339–349]

Liu K, Tsujimoto H, Cha SJ, Agre P, Rasgon JL, 2011. Aquaporin water channel AgAQP1 in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* during blood feeding and humidity adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(15): 6062–6066.

Mathew LG, Campbell EM, Yool AJ, Fabrick JA, 2011. Identification and characterization of functional aquaporin water channel protein from alimentary tract of whitefly, *Bemisia tabaci*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41(3): 178–190.

Rosell RC, Davidson EW, Jancovich JK, Hendrix DL, Brown JK, 2003. Size limitations in the filter chamber and digestive tract of nymphal and adult *Bemisia tabaci* whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 96(4): 544–552.

Shakesby AJ, Wallace IS, Isaacs HV, Pritchard J, Roberts DM, Douglas AE, 2009. A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39(1): 1–10.

Tatsumi K, Tsuji S, Miwa H, Morisaku T, Nuriya M, Orihara M, Kaneko K, Okano H, Yasui M, 2009. *Drosophila big brain* does not act as a water channel, but mediates cell adhesion. *FEBS Lett.*, 583(12): 2077–2082.

Waku Y, Sumimoto KI, 1971. Metamorphosis of midgut epithelial cells in the silkworm (*Bombyx mori* L.) with special regard to the calcium salt deposits in the cytoplasm. I. Light microscopy. *Tissue Cell*, 3(1): 127–136.

Ward DT, Hammond TG, Harris HW, 1999. Modulation of vasopressin-elicited water transport by trafficking of aquaporin2-containing vesicles. *Annu. Rev. Physiol.*, 61(1): 683–697.

Yool AJ, Brokl OH, Pannabecker TL, Dantzler WH, Stamer WD, 2002. Tetraethylammonium block of water flux in Aquaporin-1 channels expressed in kidney thin limbs of Henle's loop and a kidney-derived cell line. *BMC Physiol.*, 2(4): 1–8.

（责任编辑：袁德成）